

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO**

**FERNANDA NAZARIO SARDINHA**

**ANÁLISE DE DOIS PROTOCOLOS DE ELETROPORAÇÃO  
EM OVÓCITOS BOVINOS**

**Campos dos Goytacazes  
2010**

FERNANDA NAZARIO SARDINHA

ANÁLISE DE DOIS PROTOCOLOS DE ELETROPORAÇÃO  
EM OVÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Angelo José Burla Dias

Campos dos Goytacazes

2010

FERNANDA NAZARIO SARDINHA

ANÁLISE DE DOIS PROTOCOLOS DE ELETROPORAÇÃO EM  
OVÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 18 de junho de 2010

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (Doutor, Reprodução Animal)- UENF

---

Prof. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutor, Reprodução Animal)- UENF

---

Prof. Felipe Zandonadi Brandão (Doutor, Reprodução Animal)- UFF

---

Prof. Angelo José Burla Dias (Doutor, Reprodução Animal)- UENF  
(Orientador)

Dedico à minha Giulia,  
com todo meu amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu perseverança e força para enfrentar as dificuldades;

Ao meu marido que sempre esteve ao meu lado;

À minha mãe pelo apoio, ensinamentos pra toda vida, e exemplo de uma mulher vitoriosa;

À minha filha, fonte de inspiração e alegria;

Aos meus bichos, companheiros de todas as horas;

Ao meu pai pela paz e afeto;

Aos técnicos e amigos do laboratório LRMGA e da UENF pela amizade e cooperação;

Ao meu orientador pela paciência e dedicação;

Aos professores pelos ensinamentos,

e finalmente a UENF pelo apoio financeiro e pela oportunidade de obter o grau de Mestre.

*“A dificuldade induz ao desafio. A perseverança conduz ao caminho da vitória.”*

Autor: desconhecido.

SARDINHA, Fernanda Nazário, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2010. Análise de dois protocolos de eletroporação em ovócitos bovinos. Professor orientador: Angelo José Burla Dias.

Resumo: A eletroporação consiste na aplicação de um campo elétrico, com o objetivo de formação de poros transitórios na matriz lipídica e aumento temporário na permeabilidade da membrana plasmática. Nesse trabalho foi avaliado o efeito de dois tratamentos de eletroporação em placa, sobre o tempo de reestruturação da membrana plasmática, ocorrência de partenogênese e a viabilidade celular, medida pela taxa de indução química da partenogênese em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. As eletroporações foram realizadas em meio contendo trealose 290 mM e sulfato de magnésio 0,1 mM, sendo que no tratamento 1 (T1) foram utilizados dois pulsos de 130V, com duração de 50  $\mu$ s cada, enquanto no tratamento 2 (T2) os ovócitos foram expostos a cinco pulsos de 150V, com duração de 3 $\mu$ s cada. O tratamento T2 resultou em maior percentual de ovócitos permeabilizados após a eletroporação que o tratamento T1 (80 e 70%, respectivamente), porém com um maior tempo de reestruturação da membrana plasmática. A eletroporação elevou os índices de partenogênese nos grupos tratados em comparação com o controle, de forma significativa (T1 26,25%, T2 28,75%, controle 2,5%, respectivamente). Maior viabilidade celular foi observada em ovócitos de T2 que nos de T1 (50% e 27,5%), respectivamente, porém ambos os tratamentos resultaram em diminuição da viabilidade celular quando comparados ao controle (76,25%). O tratamento T2 apresentou melhores resultados que o T1, porém ambos os tratamentos induziram o aumento da taxa de partenogênese e redução do desenvolvimento embrionário. A eletroporação se mostrou um método prático e eficaz para induzir a abertura de poros na membrana plasmática de ovócitos bovinos. Diante dos resultados obtidos faz-se necessário avaliar parâmetros mais adequados para eletroporação de ovócitos bovinos, de forma a permitir a abertura de poros transitórios sem comprometer a capacidade de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: eletropermeabilização, poros transitórios, ovócitos bovinos

SARDINHA, Fernanda Nazário, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. June, 2010. Analysis of two electroporation protocols in bovine oocytes. Advisor: Angelo José Burla Dias.

Abstract: Electroporation involves the application of an electric field with the goal of formation transient pores in the lipid matrix and temporary increase the permeability of the plasma membrane. In this study, the effects of two treatments of electroporation were evaluated over the time of plasma membrane restructuring, occurrence of parthenogenesis and cell viability, measured by the rate of chemical induction of parthenogenesis. The electroporations were performed in medium containing 290 mM trehalose and 0.1 mM magnesium sulfate, and in the treatment 1 (T1) were performed two pulses of 130V and 50  $\mu$ s length, while in treatment 2 (T2) oocytes were exposed to five pulses of 150V and 3 $\mu$ s length. Treatment T2 resulted in a higher percentage of oocytes permeabilized after electroporation than treatment T1 (80 and 70% respectively), however more time was required to restructure the plasma membrane. Electroporation increased the rates of parthenogenesis in the treated groups compared with control, significantly (T1 26.25%, T2 28.75%, control 2.5%, respectively). Highest cell viability was observed in T2 oocytes than T1 oocytes (50% and 27.5%) respectively, but both treatments resulted in a decrease in cell viability when compared to control (76.25%). Electroporation can be a tool for introduction of molecules in bovine oocytes, however should evaluate other combinations of parameters that provide the most gametes viability.

Key-words: electroporation, transient pores, bovine oocytes

## **Lista de Abreviaturas**

**A23187** - Ionóforo de cálcio

**CCO** - Complexo *cumulus oophorus*

**CHX** - Ciclohexamida

**6-DMAP** - 6- dimetilaminopurina

**FSH** - Hormônio Folículo Estimulante

**HV** - Alta Voltagem

**IP** - Iodeto de propídeo

**LH** - Hormônio Luteinizante

**PBS** - Solução salina fosfatada tamponada

**PVA** - Álcool polivinílico

**T1**- Tratamento 1 (2 pulsos no modo HV, 130 V por 50  $\mu$ s de comprimento de pulso)

**T2** - Tratamento 2 (5 pulsos no modo HV, 150V por 3  $\mu$ s de comprimento de pulso)

**MPF** - Fator promotor da maturação

**SNK** - Student-Newman-Keuls

## SUMÁRIO

<b>1-Introdução</b>	10
<b>2- Revisão de Literatura</b>	12
2.1- Eletroporação de ovócitos	12
2.2- Uso da trealose no meio de eletroporação	14
2.3-Tempo de reestruturação celular	14
2.4-Viabilidade ovocitária após eletroporação	15
2.5- Ativação partenogenética	17
<b>3- Material e Métodos</b>	21
3.1- Obtenção dos complexos <i>cumulus oophorus</i>	21
3.2- Maturação <i>in vitro</i>	21
3.3-Eletroporação	21
-----	
3.4-Cultivo <i>in vitro</i>	22
3.5- Avaliação do tempo de reestruturação da membrana celular	22
3.6- Avaliação da indução física da partenogênese pelos tratamentos utilizados	23
-----	
3.7- Determinação da viabilidade celular	24
3.8- Tratamento estatístico dos dados	25
<b>4- Resultados</b>	26
4.1- Avaliação do tempo de reestruturação da membrana celular	26
4.2- Indução física da partenogênese pelos tratamentos utilizados	26
4.3- Efeito da eletroporação sobre a viabilidade celular	27
<b>5- Discussão</b>	28
<b>6-Conclusão</b>	34
<b>Referências Bibliográficas</b>	35
<b>Anexo A- Lista de Referência dos Reagentes</b>	42
<b>Anexo B- Lista de Referência dos Equipamentos</b>	43

## 1- INTRODUÇÃO

A eletroporação é uma técnica utilizada na biologia celular para transferência de genes, RNA, proteínas, moléculas extracelulares, hibridização de células, terapia gênica, quimioterapia e como via de aplicação de medicamentos (ROLS & TEISSIÉ, 1998; TEISSIE et al, 2005). Apesar de essa técnica possuir inúmeras aplicabilidades, o mecanismo através da qual ela atua e seu efeito sobre a viabilidade celular ainda não estão totalmente elucidados (ROLS & TEISSIÉ, 1998; TEISSIE et al, 2005). Sugere-se que essa bioferramenta atue por meio de um campo elétrico que induz um aumento do potencial transmembrana acima do limiar crítico de permeabilização, provocando uma alteração da membrana, enquanto o campo elétrico se mantém elevado, resultando na formação de poros temporários. Assim que esse decresce, a membrana se reorganiza. A viabilidade celular é preservada, mas a estrutura e as propriedades fisiológicas da membrana só são recuperadas após algumas horas (TEISSIE et al, 2005).

Raras são as informações sobre a utilização desse método em ovócitos bovinos, assim como protocolos específicos para esses gametas. É difícil ainda precisar quais são os melhores parâmetros para a introdução de macromoléculas, sem que isso acarrete prejuízo da viabilidade celular. A técnica pode apresentar alguns inconvenientes como, a deformação da célula, o desarranjo dos fosfolípidios de membrana (TEISSIE et al, 2005), a formação de espécies reativas de oxigênio (KOO et al., 2008), e o alto custo do aparelho. No entanto, essa técnica possui vantagens como a alta reprodutibilidade e facilidade de execução (SCHMOTZER, 2002). Além disso, esta ferramenta apresenta grande potencial para ser utilizada em protocolos de criopreservação de gametas femininos (FRANCO e DIAS, 2006), em protocolos de ativação partenogenética, em laboratórios de reprodução e preservação de recursos genéticos.

Trabalhos preliminares constataram que a introdução citoplasmática da trealose por meio da eletroporação resultou em um efeito benéfico sobre a criopreservação de ovócitos bovinos maturados *in vitro* (FRANCO e DIAS, 2006). Com relação à ativação partenogenética, foi descrito que os estímulos elétricos promovem maior taxa de clivagem em ovócitos suínos quando comparado com protocolos químicos utilizando etanol e 6-DMAP (> 70% e < 50%, respectivamente) (LEAL & LIU, 1998).

Devido às inúmeras aplicações e a grande falta de informações sobre mecanismo de ação da eletroporação sobre os ovócitos bovinos (TEISSIE et al, 2005) realizou-se esse trabalho com objetivo de avaliar o efeito de dois protocolos de eletroporação sobre a viabilidade celular, taxa de indução da partenogênese e o tempo de reestruturação celular, visando contribuir para a incorporação da técnica em laboratórios de reprodução animal.

## **2- REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1-Eletroporação de ovócitos**

A eletroporação é uma técnica recente e existe uma grande falta de informação a respeito desse assunto (TEISSIE et al, 2005). O trabalho de permeabilização de células exige que alguns parâmetros sejam avaliados para garantir a introdução das macromoléculas para o interior do ovócito e, ao mesmo tempo permita a preservação da viabilidade celular (TEISSIE et al, 2005). Esses parâmetros são: campo elétrico, voltagem, comprimento, número e duração de pulsos, temperatura e condutividade da solução (ROLS e TEISSIÉ, 1998). O campo elétrico (kV/cm) varia de acordo com a voltagem aplicada às células e com a distância entre os eletrodos do equipamento de eletroporação (CATALADO et al, 1998). Em geral, o campo elétrico utilizado para transformar células de mamíferos é de 0,25-3kV/cm (CHANG et al, 1992). A voltagem necessária para promover a formação dos poros é inversamente proporcional ao tamanho da célula, logo células com diâmetros maiores, como os ovócitos, exigem menores voltagens para garantia da sobrevivência.

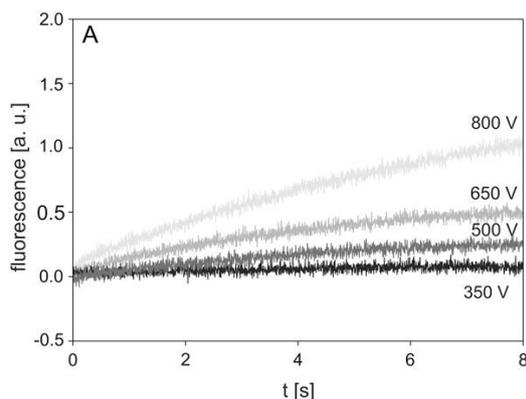
O comprimento do pulso deve ser regulado de acordo com a condutividade do meio, quanto maior for a condutividade do meio, menor deverá ser o comprimento do pulso. Por sua vez, a condutividade do meio varia de acordo com o conteúdo iônico da solução. Quanto menor o conteúdo iônico, menor será a resistência do meio e melhor será a sua condutividade. O ideal é que a solução apresente mínimo conteúdo iônico, pois apresentará características como alta condutividade e baixa resistência. Ademais, a eficiência dessa biotécnica pode ser prejudicada ao se utilizar soluções contendo cátions bivalentes. Esses possuem a propriedade de estabilizar a membrana e aumentar os índices de partenogênese, dificultando a formação transitória dos poros (NEUMANN et al., 1982) e de embriões viáveis.

A temperatura é outro fator importante para a viabilidade celular durante e após a eletroporação. A maioria dos protocolos é feita à temperatura ambiente, e posteriormente, as células são incubadas no gelo. Esta biotécnica induz um aumento temporário da temperatura, que pode causar sérios danos à célula. Esse problema pode ser contornado ao usar uma solução de pouco conteúdo iônico, pulsos curtos e baixo campo elétrico (TEISSIE et al, 2005).

O tempo de incubação é outra variável que merece consideração, e esse, logicamente, irá variar de acordo com o tempo que os poros permanecem abertos (ANDREASON & EVANS, 1989).

Vários autores sugerem que diferentes mecanismos governam o transporte de moléculas e íons durante e após o pulso elétrico. Apesar do transporte durante o pulso ocorrer basicamente pela eletroforese e parcialmente pela difusão, o transporte após o pulso ocorre predominantemente pela difusão (PUC et al., 2003). O transporte de íons e moléculas continua por segundos ou até mesmo por minutos após a eletroporação, até que a membrana celular se recupere completamente, ou até que se atinja a concentração de equilíbrio de íons e moléculas entre o exterior e o interior da célula. Ao contrário, a condutividade da membrana, que é elevada durante o pulso, retorna ao valor próximo do inicial muito mais rápido, milissegundos após a exposição (SCHMEER et al., 2004; PAVLIN et al., 2007).

Pucihar et al. (2008), ao trabalhar com células de ovário de hamster chinês, avaliaram o papel da amplitude e da duração do pulso sobre células isoladas ou sobre o conjunto de células presente em uma suspensão, além do transporte molecular utilizando como marcador o iodeto de propídeo. Ao submeterem células isoladas a um pulso de 1ms de comprimento com diferentes amplitudes (350, 500, 650, e 800V; correspondendo respectivamente a 700, 1000, 1300 e 1600 V/cm, respectivamente) observaram mudanças na fluorescência, que foi monitorada em um intervalo de 8s. Um lento aumento na fluorescência, refletindo o transporte de IP para dentro da célula, foi detectado após a aplicação do pulso na amplitude de 500V



(Figura 1). Amplitudes maiores (650V, 800V) resultaram em maior grau de fluorescência, enquanto a mudança na fluorescência foi fracamente detectada ao utilizar a amplitude de 350V.

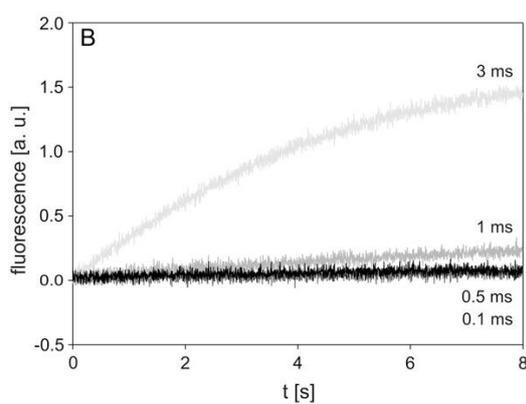


Figura 1: Intervalo de tempo medido em uma única célula. (A) A influência da amplitude do pulso, e (B) da duração do pulso sobre a intensidade de fluorescência medida em uma única célula. Células de ovário de hamster

## **2.2.- Uso da trealose no meio de eletroporação**

A trealose é um dissacarídeo de glicose, encontrado em vários organismos capazes de tolerar a desidratação. É considerada um crioprotetor não penetrante, atóxico e que possui alta temperatura de transição vítrea (-30 °C), a qual permite estabilidade em ampla faixa de temperatura e aumento da capacidade de transformação vítrea (EROGLU et al., 2002).

Esta substância participa da estabilização de membranas celulares durante o congelamento e descongelamento (NICOLA et al., 1999; EROGLU et al., 2000), e promove proteção tanto contra os efeitos deletérios da desidratação excessiva de macromoléculas e estruturas celulares de diversos organismos da natureza (CROWE et al., 1992) quanto contra agentes oxidativos, protegendo as células e especialmente as membranas (HERDEIRO et al., 2006). Alguns pesquisadores, após estudos de dinâmica molecular, propuseram que a interação entre a trealose e a membrana fosfolipídica acontece preferencialmente através de pontes de hidrogênio, que se tornam mais intensas à medida que o sistema perde água. Entretanto, não se pode precisar ainda, se a trealose substitui a água presente nas células em seu estado não desidratado, ou a aprisiona, impedindo que seja eliminada para o meio durante a desidratação que ocorre durante o processo de criopreservação (SOARES & SILVA, 2008).

Franco e Dias (2006) realizaram a eletroporação de ovócitos bovinos em solução de trealose utilizando 3 a 5 pulsos, com voltagem que variou de 130 a 250 V e comprimento de pulso de 3 a 5  $\mu$ s para a permeabilização da membrana ovocitária. O tratamento que obteve melhor viabilidade e integridade de membrana plasmática (60%) foi com o uso de 5 pulsos, de 150 V e 3  $\mu$ s de comprimento. Hastenreiter (2006, dados não publicados) obteve 80% de retorno ao volume isotônico e 29% de integridade de membrana dos ovócitos bovinos maturados *in vitro*, com o uso de 8 pulsos de 150 V e comprimento de 50  $\mu$ s, em solução de trealose.

## **2.3-Tempo de reestruturação celular**

O restabelecimento da integridade da membrana plasmática após a eletroporação é um dos parâmetros chave que influenciam não somente a

viabilidade celular, mas também a quantidade de solutos captados pelas células eletroporadas (SHYRAKASHY et al., 2002). Após a eletroporação, a extensão da permeabilização da membrana plasmática diminui em função do tempo, sendo que sua reestruturação é muito mais lenta que a formação dos poros (TEISSE et al., 2005). Os mecanismos de recuperação ainda são desconhecidos (WEAVER et al., 2003), mas sabe-se que alguns fatores governam essa recuperação como a energia elétrica remanescente, a temperatura (e a flutuação de temperatura), e a composição da membrana (WEAVER et al., 2003). Existe também uma dependência linear entre o tempo de permeabilização celular e a duração do pulso elétrico e o número de pulsos (ROLS e TEISSIÉ, 1998).

Shyrakashy et al. (2002), ao avaliarem o tempo de restabelecimento de células Sp2 de mieloma, através da cinética de captação de iodeto de propídeo, medida pela citometria de fluxo, verificaram que após 10 minutos da eletroporação a membrana plasmática encontrava-se novamente impermeável a esse marcador.

Outro dado importante é que a permeabilização irreversível, e conseqüente morte celular, também ocorre em um percentual de células eletroporadas, sendo que esse percentual aumenta conforme o campo elétrico se eleva acima de 3 kV/cm (SHYRAKASHY et al., 2002).

#### **2.4- Viabilidade ovocitária após eletroporação**

A viabilidade pode ser avaliada pela morfologia ovocitária (LONERGAN et al., 2001), pela citometria de fluxo utilizando um marcador impermeável à membrana como o iodeto de propídio (MUSSAUER et al., 2001), pela ativação partenogética de ovócitos maturados (LIU & MOOR, 1997; WANI, 2008), pela determinação da atividade mitocondrial (THOUAS et al., 2004), pelas taxas de fertilização *in vitro* e conseqüente pelo desenvolvimento embrionário e finalmente pela prenhez e habilidade de produzir uma cria (LONERGAN et al., 2001; MIKKELSEN & LINDENBERG, 2001).

Ovócitos viáveis, sem nenhuma anormalidade são classificados como Grau I, apresentam citoplasma claro, com textura uniforme e grânulos finos e homogêneos, o primeiro corpúsculo polar redondo ou ovóide com a superfície lisa e o espaço perivitelino com tamanho normal. Os ovócitos podem apresentar anormalidades extracitoplasmáticas, como o primeiro corpúsculo polar fragmentado ou enrugado,

ou um grande espaço perivitelino, ou anormalidades citoplasmáticas, como citoplasma escuro, granular ou com corpos refratáveis. Os ovócitos com uma anormalidade são classificados como Grau II, enquanto os ovócitos com duas anormalidades são classificados como Grau III (MIKKELSEN & LINDENBERG, 2001). Ovócitos MII com anormalidades morfológicas são geralmente associados com uma diminuição no potencial de fertilização, clivagem e desenvolvimento até embriões viáveis (MIKKELSEN & LINDENBERG, 2001).

A viabilidade dos ovócitos também pode ser mensurada pela exposição dessas células ao iodeto de propídeo, um marcador fluorescente impermeável à membrana celular e que se liga ao DNA (THOUAS et al., 2004). A emissão de fluorescência aumenta fortemente quando esse corante está ligado a proteínas e ácidos nucleicos (PUCIHAR et al., 2008). Dessa forma, ovócitos que emitem fluorescência vermelha são considerados danificados, enquanto aqueles que não emitem a fluorescência são considerados viáveis (MUSSAUER et al, 2001).

Já a ativação partenogenética é uma ferramenta útil para acessar a qualidade dos ovócitos maturados *in vitro*, especialmente em suínos, já que a fertilização *in vitro*, nessa espécie, não é um bom critério para avaliar a maturação citoplasmática devido às altas taxas de polispermia (LIU & MOOR, 1997).

As mitocôndrias dos ovócitos são reguladores fisiológicos do desenvolvimento embrionário inicial e são locais onde podem ocorrer insultos patológicos que podem afetar a viabilidade celular e o subsequente desenvolvimento embrionário (THOUAS et al., 2004). A associação do fenômeno da morte celular com as mitocôndrias aumentou o interesse nessa organela, especialmente por ter sido reconhecido que ela apresenta um papel crucial na apoptose, dessa forma técnicas foram desenvolvidas para estudar as mitocôndrias em células intactas utilizando fluorocromos lipofílicos catiônicos (SANTOS et al., 2003). Vários fluorocromos como o 10-N-nonil-laranja de acridina, iodeto de dimetilodioxiacianina, a rodamina 123 e o JC1 são utilizados para estudar o comportamento das mitocôndrias, incluindo aspectos como a massa mitocondrial, o potencial de membrana mitocondrial, a distribuição de mitocôndrias na célula, e a atividade das glicoproteínas-P (SANTOS et al., 2003).

O desenvolvimento da citometria de fluxo e da microscopia confocal tem acelerado tais trabalhos, porém os fatores que governam o acúmulo de fluorocromos

em vários compartimentos da célula não são ainda bem compreendidos, complicando a interpretação dos resultados.

Outra maneira de avaliar a qualidade de um ovócito é determinada pela sua habilidade em ser fertilizado, se desenvolver até o estágio de blastocisto, estabelecer uma prenhez e finalmente gerar uma cria (LONERGAN et al., 2001). Mais de 60% dos ovócitos imaturos não atingem o estágio de blastocisto, e esta falha provavelmente está relacionada à qualidade intrínseca do ovócito no início da maturação (LONERGAN et al., 2001). As condições de cultivo podem influenciar a cinética do desenvolvimento inicial (LANGENDONCKT et al., 1997), mas os principais fatores que controlam esse parâmetro são intrínsecos do ovócito (BREVINI-GANDOLFI et al., 2000; LONERGAN et al., 2000), do espermatozóide (COMIZZOLI et al., 2000; WARD et al., 2001), ou de ambos.

A viabilidade celular após a eletroporação depende não somente da reestruturação da membrana celular, mas também de outros fatores, incluindo o papel de processos ativos (CHEN et al, 2006) e a composição do meio de eletropermeabilização (SHYRAKASHY et al, 2002). A eletroproteção mediada pela trealose melhora a sobrevivência de células mamíferas a curto e longo prazo (MUSSAUER et al, 2001), sendo que a substituição do inositol pela trealose produz um aumento do valor do  $LE_{50}$  (campo elétrico no qual 50% das células são irreversivelmente eletroporadas), de 2kV/cm no inositol para 4kV/cm na trealose (SHYRAKASHY et al, 2002). Isso provavelmente ocorre pela rigidez da membrana plasmática induzida pela trealose através de ligações tipo pontes de hidrogênio com as cabeças de fosfolípidos (BARDOS-NAGY et al, 2001).

## **2.5- Ativação partenogenética**

Os ovócitos são ovulados no estágio de metáfase II (MII) e permanecem nesta fase da divisão celular até que sejam fertilizados por um espermatozóide ou ativados partenogeneticamente (PERECIN et al., 2007). A fertilização ou ativação partenogenética recupera a habilidade do ovócito em continuar o ciclo celular (resolução da meiose), ao induzir uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, nomeadas como ativação (TALMOR-COHEN et al., 2002).

Quando um espermatozóide penetra em um ovócito em estágio de metáfase II (MII), acarreta uma série de modificações celulares e bioquímicas, como

oscilações no  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular; exocitose de grânulos corticais; fosforilação e defosforilação de proteínas reguladoras do ciclo celular, conclusão da meiose, formação dos pro núcleos e divisão celular (PERECIN et al., 2007). A elevação dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular inibe a defosforilação da P34<sup>cdc2</sup> quinase, a qual reduz a atividade do Fator Promotor de Maturação (MPF) e ativa o ovócito.

Os ovócitos também podem ser ativados artificialmente através de tratamentos químicos via elevação do  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático para inibir a atividade do MPF (SHEN et al., 2008). Collas et al. (1993) trabalhando com ovócitos bovinos demonstraram que a ativação elétrica também é possível, através de um único pulso elétrico, cuja a atividade da MPF quinase apresenta uma queda transitória ou através de múltiplos pulsos, os quais provocam a completa supressão da MPF-quinase, mimetizando o processo de fertilização.

A ativação da partenogênese pode ser usada como uma ferramenta para avaliar a qualidade dos ovócitos, para produção de citoplasmas úteis para a clonagem embrionária e para estudos da influência da ploidia e da influência genotípica parental no desenvolvimento de animais (LIU & MOOR, 1997). A ativação artificial dos ovócitos tem sido induzida em várias espécies por agentes químicos, incluindo ionóforos de cálcio, estrôncio, etanol, ciclohexamida, ionomicina, 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), entre outros (LIU & MOOR, 1997, MÉO et al., 2009). Dentre os vários agentes utilizados para a ativação partenogenética, a ionomicina (CHE et al., 2007) , o estrôncio (CUTHBERTSON et al., 1981), o pulso elétrico, o etanol e os ionóforos de cálcio (SHEN et al., 2008) promovem uma elevação do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, já o 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; SUSKO-PARRISH et al., 1994) inibe a fosforilação de proteínas e a atividade do MPF, enquanto a ciclohexamida inibe a síntese de proteínas. O 6-DMAP afeta a organização dos fusos da placa metafásica e acelera a progressão do ciclo celular (MÉO et al., 2007) quando comparado ao estrôncio, que é considerado um tratamento mais fisiológico que promove pulsos periódicos de cálcio intracelular semelhante à fertilização no camundongo (BOSMIKICH et al., 1995). No entanto, maior taxa de formação de pro núcleos foi observada ( $p < 0.05$ ) ao utilizar 6-DMAP (43,2%) do que estrôncio (39,1%) (MÉO et al., 2009). Shen et al. (2008), trabalhando com clonagem animal obtiveram maior taxa de formação de blastocistos ao utilizar o ionóforo de cálcio A23187 combinado com 6-DMAP (51,6%) do que o tratamento de ciclohexamida (CHX) e citocalasina B (14,3%) e obtiveram taxas de blastocistos semelhantes entre ovócitos reconstruídos

e ativados através de pulsos elétricos (30,5%) versus A23187 (42,2%) ou através de A23187 (36,7%) versus ionomicina (33,3%) combinados com 6-DMAP, respectivamente.

A ativação da partenogênese pode também ser induzida por estímulos elétricos e tem sido amplamente utilizada em estudos de transplante nuclear com fins de iniciar o desenvolvimento nuclear dos embriões transplantados (LIU & MOOR, 1997; SHEN et al., 2008). O efeito de um único pulso elétrico com diferentes campos elétricos e durações sobre a formação de pro núcleos em ovócitos suínos foi estudado anteriormente (PRATHER et al., 1991; PROCHAZA et al., 1992; SUN et al., 1992), enquanto o trabalho de Ozil (1990) em coelhos estabeleceu que a frequência dos pulsos determina o desenvolvimento subsequente dos partenotos. Liu & Moor (1997) verificaram que a taxa de clivagem, analisada 24 horas após o estímulo elétrico, foi menor utilizando um único pulso (52,2%) ou 3 pulsos com intervalo de 1s (57,1%) do que 3 pulsos com intervalo de 5 minutos (78,8%, P 0,05). Além disso, após 72 horas de cultivo *in vitro*, o desenvolvimento até o estágio de 4 células ou mais foi muito maior no tratamento com 3 pulsos com intervalos de 5 minutos entre eles do que um único pulso.

Existem outros fatores que afetam o desenvolvimento partenogenético, como o tempo de maturação dos ovócitos, o período de tempo entre a eletrofusão e ativação química e o conteúdo do meio de eletroporação (LIU & MOOR, 1997; SHEN et al., 2008). A taxa de clivagem, após 24 horas de cultivo, de ovócitos suínos eletro-estimulados em meio à base de manitol foi significativamente maior nos ovócitos maturados por 53-54h do que nos ovócitos maturados por 48-49h (79,8 vs. 37,2%), no entanto, em meio à base de inositol, não houve influência da idade dos ovócitos sobre a taxa de clivagem *in vitro* (LIU & MOOR, 1997). Esses mesmos autores observaram que em ovócitos jovens (maturados por 48 horas) o meio contendo inositol foi mais favorável para o desenvolvimento partenogenético que o meio contendo manitol (58,3 vs. 37,2%). Além disso, verificaram que na ausência de íons  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  nos meios de eletroporação os percentuais de clivagem foram semelhantes à ativação espontânea em ovócitos suínos (15%). Semelhantemente Koo et al. (2008), compararam diferentes concentrações de  $Ca^{+2}$  no meio de eletroporação (0; 0,05; 0,1mM) e observaram taxas de clivagem (70,7%, 87%, 88,9% respectivamente), formação de blastocistos (8,2%, 20,2%, 20%) e formação

de espécies oxigênio reativas (11,1%, 14%, 15,8%) mais elevadas nos meios contendo maior concentração de  $Ca^{+2}$ .

Estudos recentes têm demonstrado que o desenvolvimento de ovócitos reconstruídos é significativamente melhor quando os núcleos de células doadoras são fusionados e expostos aos citoplasmas de ovócitos recipientes por várias horas antes do tratamento de ativação (SHIN et al., 2001; AKAGI et al., 2003; CHOI et al., 2004; SHEN et al., 2008).

A ativação também pode ocorrer de forma espontânea. Lechniak et al. (1997) observaram a ativação espontânea em 9,5% dos ovócitos bovinos maturados *in vitro* e os partenotos apresentaram diferentes estágios de desenvolvimento (2 a 8 blastômeros). A análise citogenética desses partenotos revelou que 62,5% exibiam um cromossoma diplóide normal, enquanto os outros 37,5% apresentavam várias anormalidades de ploidia: aploidia (25%), triploidia (4,2%) e tetraploidia (8,3%).

As condições de cultivo *in vitro* para os ovócitos são diferentes das condições do trato reprodutivo feminino. Sob condições *in vitro*, os ovócitos são expostos a uma variedade de estímulos físicos e químicos que podem desestabilizar o bloqueio da meiose e resultar em partenogênese (LECHNIAK et al.1997).

Em ovócitos partenogeneticamente ativados, o segundo corpúsculo polar pode ser extrusado e um partenoto haplóide se desenvolve. Se a segunda divisão meiótica não ocorre, um partenoto diplóide é formado (HAGEMANN et al.,1995). O tipo de partenoto formado depende do estímulo de ativação, da sua intensidade, da idade do ovócito pós-ovulação, e das condições de ativação (osmolaridade, pH, temperatura do meio de cultivo) (LECHNIAK et al.1997).

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Obtenção dos complexos *cumulus oophorus*:**

Os complexos *cumulus oophorus* (CCO) foram obtidos a partir de ovários oriundos de matadouros no município de Campos dos Goytacazes, entre outubro de 2008 e maio de 2009. Os ovários foram transportados até o laboratório em solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril contendo penicilina e estreptomicina, à temperatura ambiente.

Apenas folículos ovarianos com diâmetro de 2 a 8 mm foram aspirados. Os CCO recuperados foram transferidos para uma gota de meio de manipulação (meio 199-Hepes, soro fetal bovino a 5%, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL), onde se efetuou a avaliação e classificação dos mesmos. Somente aqueles classificados como Grau I e II (DE LOSS et al. 1989), foram utilizados.

#### **3.2- Maturação *in vitro*:**

Os CCO selecionados foram transferidos para gotas de 100 µL de meio de maturação (LH 5µg/mL, FSH 0,5µg/mL, soro fetal bovino 10%, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, em meio 199 bicarbonatado), sob óleo mineral. Cada gota, contendo aproximadamente 20 CCO, foi mantida em estufa com umidade saturada, temperatura de 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 22 horas. Após a maturação, os CCO foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos.

#### **3.3- Eletroporação:**

Os ovócitos foram desnudados de forma mecânica por meio de sucessivas pipetagens com auxílio de pipeta calibrada para 120 µL, em PBS suplementado com PVA 0,1%. Em seguida os ovócitos foram lavados em gotas de 150µl de meio de eletroporação (trealose 290 mM, sulfato de magnésio 0,1 mM) e transferidos para uma placa de eletroporação (BTX 450) contendo 200µl desse mesmo meio. A concentração de trealose e sulfato de magnésio presente na solução de eletroporação foi semelhante à descrita no manual de eletroporação BTX (2001). A eletroporação foi realizada em um eletromanipulador (ECM 2001, BTX), utilizando-se dois diferentes tratamentos: 2 pulsos no modo alta voltagem (HV), 130V por 50µs de

comprimento de pulso (T1) (MENG et al., 1997) e 5 pulsos no modo HV, 150V por 3  $\mu$ s de comprimento de pulso (T2) (FRANCO & DIAS, 2006).

### **3.4- Cultivo *in vitro***

Os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 100 $\mu$ l de meio de cultivo (meio 199 bicarbonatado, acrescido de soro fetal bovino 10%, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100  $\mu$ g/mL), cobertas por óleo mineral, a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 7 dias. Após 72 h de cultivo foi realizada a substituição de 75% da gota por meio novo.

### **3.5- Avaliação do tempo de reestruturação da membrana celular:**

Após a eletroporação, ovócitos de T1 e de T2 foram colocados em condições de cultivo *in vitro*, onde permaneceram por 30, 60 ou 90 minutos. Como controle, os ovócitos de ambos os tratamentos foram analisados cinco minutos após a eletroporação. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições, com 20 ovócitos cada, perfazendo um total de 640 ovócitos avaliados. Após cada um dos tempos supracitados, os ovócitos foram submetidos à marcação fluorescente com iodeto de propídio (IP), uma molécula com peso molecular de 668 Da, não permeável à membrana plasmática, para avaliar o intervalo de tempo necessário para o fechamento dos poros da membrana induzidos pela eletroporação. Para isso os ovócitos foram transferidos para solução de iodeto de propídio (10 $\mu$ g/mL, em PBS), por dez minutos, ao abrigo da luz. Em seguida foram lavados em PBS acrescido de PVA 0,1%. Os ovócitos foram colocados sobre lâmina e observados com auxílio de um microscópio de fluorescência (TE 300, Nikon), sob aumento de 400x. Ovócitos que emitiam fluorescência vermelha (marcados pelo IP) foram considerados como apresentando poros abertos na membrana plasmática.

TABELA 1: Tratamentos utilizados para a avaliação do tempo de reestruturação celular

Tratamentos	Total de	
C1- Controle	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(2 pulsos,HV-130V por 50µs) sem cultivo <i>in vitro</i></u>	80
T1- 30'	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(2 pulsos,HV-130V por 50µs) com cultivo <i>in vitro</i>/30'</u>	80
T1- 60'	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(2 pulsos,HV-130V por 50µs) com cultivo <i>in vitro</i>/60'</u>	80
T1- 90'	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(2 pulsos,HV-130V por 50µs) com cultivo <i>in vitro</i>/90'</u>	80
C2- Controle	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(5 pulsos, HV-150V por 3 µs) sem cultivo <i>in vitro</i></u>	80
T2- 30'	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(5 pulsos, HV-150V por 3 µs) com cultivo <i>in vitro</i>/30'</u>	80
T2- 60'	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(5 pulsos, HV-150V por 3 µs) com cultivo <i>in vitro</i>/60'</u>	80
T2- 90'	<u>Ovócitos submetidos à eletroporação(5 pulsos, HV-150V por 3 µs) com cultivo <i>in vitro</i>/90'</u>	80
<b>Total de CCO</b>		<b>640</b>

### 3.6- Avaliação da indução física da partenogênese:

Para determinar se ambos os tratamentos promoveram a indução física da partenogênese, após a eletroporação os ovócitos foram colocados em condições de cultivo *in vitro* por sete dias. Como controle, ovócitos maturados *in vitro* que não foram submetidos à eletroporação, foram mantidos nas mesmas condições de cultivo *in vitro* que os ovócitos eletroporados. Foram considerados ativados partenogeneticamente ovócitos que apresentaram ao menos uma clivagem no período de cultivo *in vitro*.

TABELA 2: Tratamentos utilizados para a avaliação da indução física da partenogênese

Tratamentos	Total de CCO
C p- Controle Ovócitos maturados <i>in vitro</i> , seguido de cultivo <i>in vitro</i> / 7 dias	80
T1-p Ovócitos submetidos à eletroporação(2 pulsos,HV- 130V por 50µs) seguido de cultivo <i>in vitro</i> / 7 dias	80
T2- p Ovócitos submetidos à eletroporação(5 pulsos, HV- 150V por 3 µs) seguido de cultivo <i>in vitro</i> / 7 dias	80
Total de CCO avaliados	240

### 3.7- Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pela indução química da partenogênese. Os ovócitos foram distribuídos de forma aleatória entre os tratamentos (T1, T2 e controle). A indução química foi realizada após a eletroporação, exceto nos ovócitos do grupo controle, que foram expostos a ativação química, logo após a maturação *in vitro*. Foram realizadas quatro repetições, com 20 ovócitos cada, perfazendo um total de 240 ovócitos avaliados.

A indução da partenogênese foi realizada segundo Wang et al. (2008). Resumidamente, os ovócitos foram incubados em meio 199 contendo 7% de etanol, durante 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida foram lavados em gotas de 100µL de meio de cultivo, e então foram transferidos para uma gota contendo 6- dimetilaminopurina (6-DMAP) 6 mM, em meio de cultivo, onde foram mantidos em incubadora com umidade saturada, temperatura de 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por três horas. Depois, os ovócitos foram lavados, transferidos e mantidos em meio de cultivo por sete dias para avaliação das taxas de clivagem. Foram considerados ativados partenogeneticamente aqueles que atingiram, ao menos, a primeira clivagem.

TABELA 3: Tratamentos utilizados para a avaliação da viabilidade celular

Tratamentos		Total de CCO
C v- Controle	Ovócitos maturados <i>in vitro</i> , seguido de indução química da partenogênese	80
T1-v	Ovócitos submetidos à eletroporação(2 pulsos, HV- 130V/ 50 $\mu$ s) seguido de indução química da partenogênese	80
T2- v	Ovócitos submetidos à eletroporação(5 pulsos, HV- 150V/ 3 $\mu$ s) seguido de indução química da partenogênese	80
Total de CCO avaliados		240

### 3.8- Tratamento estatístico dos dados

A análise dos dados foi executada avaliando-se previamente a normalidade dos dados pelo teste de Liliefors, os dados normais foram analisados pela Análise de Variância Anova 1 fator ou pelo teste Anova fatorial 4 x 2 , seguidos pelo teste pós hoc de Tukey com 5 % de confiabilidade. Os dados não normais foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido pelo teste pós hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de confiabilidade.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Avaliação do tempo de reestruturação da membrana celular:

Em ambos os tratamentos houve uma redução gradativa do número de ovócitos marcados pelo iodeto de propídio, conforme o aumento do tempo de cultivo *in vitro*. O tratamento T2 apresentou maior número de ovócitos marcados pelo IP em todos os tempos de cultivo *in vitro*, quando comparado ao T1 (Tabela 4).

Tabela 4- Percentual médio e número de ovócitos (n) eletroporados marcados com iodeto de propídio após diferentes tempos de cultivo *in vitro*

Tratamento/Tempo de cultivo	5'	30'	60'	90'	Total
T1- % média (desvio)	70% <sup>aA</sup>	35% <sup>bA</sup>	25% <sup>cA</sup>	15% <sup>dA</sup>	36,25%
(n° ovócitos marcados/ n° ovócitos avaliados)	(56/80)	(28/80)	(20/80)	(12/80)	(116/320)
T2- % média (desvio)	80% <sup>aB</sup>	70% <sup>bB</sup>	64% <sup>cB</sup>	50% <sup>dB</sup>	65,94%
(n° ovócitos marcados/ n° ovócitos avaliados)	(64/80)	(56/80)	(51/80)	(40/80)	(211/320)

a,b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas, diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey e A,B médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas, diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

### 4.2- Indução física da partenogênese:

Ambos os tratamentos de eletroporação promoveram a indução da partenogênese, sem que houvesse diferença ( $P > 0,05$ ) entre eles, pelo teste de Student-Newman-Keuls (26,25% T<sup>130V</sup> e 28,75 T<sup>150V</sup>). A taxa de partenogênese no grupo controle foi de apenas 2,5%.

Tabela 5- Percentual médio de indução física da partenogênese e número de ovócitos clivados (n) nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Taxa de indução física da partenogênese % (desvio)	Total de CCO (n° clivados/n° analisados)
C p- Controle	2,50% <sup>a</sup>	2/80
T1-p	26,25% <sup>b</sup>	21/80
T2- p	28,75% <sup>b</sup>	23/80
Total		46/240

A,B médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem entre si pelo Student-Newman-Keuls, a 5%.

#### 4.3- Efeito da eletroporação sobre a viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pela indução química da partenogênese. Foi observado que ovócitos de T2 apresentaram maior viabilidade celular que os de T1 (50% e 27,5%, respectivamente). No entanto, ambos os tratamentos de eletroporação causaram uma redução significativa ( $P > 0,05$ ) da viabilidade ovocitária quando comparados ao tratamento controle, o qual apresentou taxa de partenogênese de 76,25%.

Tabela 6- Percentual médio de indução química da partenogênese e número de ovócitos clivados (n) nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Taxa de indução química da partenogênese % (desvio)	Total de CCO (n° clivados/n° analisados)
C p- Controle	76,25% <sup>a</sup>	61/80
T1-p	27,5% <sup>c</sup>	21/80
T2- p	50% <sup>b</sup>	40/80
Total		46/240

A,B médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem entre si pelo Student-Newman-Keuls, a 5%.

## 5- DISCUSSÃO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito de dois protocolos de eletroporação em ovócitos bovinos sob a viabilidade celular, taxa de indução da partenogênese e tempo de reestruturação celular, sendo este trabalho e resultados inéditos. A eletroporação é uma técnica recente, com diversas finalidades (ROLS & TEISSIÉ, 1998; TEISSIE et al., 2005; CHEN et al., 2006), porém pouco se sabe à respeito dos seus efeitos nas células (TEISSIE et al., 2005). Ela é uma ferramenta útil para introdução de macromoléculas nas células, sendo que trabalhos preliminares em nosso laboratório constataram que a internalização da trealose por meio da eletroporação promoveu um efeito benéfico sobre a criopreservação de ovócitos maturados bovinos, sendo que, 60% dos ovócitos tratados apresentaram viabilidade e integridade de membrana após a desvitrificação (FRANCO & DIAS, 2006).

No presente trabalho foram obtidos resultados semelhantes para os T2, porém os T1 apresentaram prejuízo da viabilidade celular. Esses resultados podem estar relacionados ao comprimento do pulso e à presença da trealose na solução de eletroporação. Mussauer et al. (2001) também verificaram que eletroproteção mediada pela trealose melhora a sobrevivência de células mamíferas a curto e longo prazo em comparação com outro açúcar, o inositol). A trealose se liga através de pontes de hidrogênio com as cabeças de fosfolípidios, promovendo uma rigidez da membrana plasmática e conferindo maior proteção à célula (BARDOS-NAGY et al., 2001).

A escolha da duração, comprimento e voltagem dos pulsos utilizados no presente trabalho foi baseada em experimentos prévios executados em nosso laboratório (FRANCO & DIAS, 2006) e dados da literatura (MENG et al, 1997).

A introdução citoplasmática de macromoléculas pode ser realizada por diferentes técnicas. A eletroporação apresenta maior facilidade de execução que métodos como a injeção intracitoplasmática (EROGLU et al., 2002; 2003; Younis et al, 2009), ao passo que pode ser tão simples quanto a utilização de técnicas como o desbalanço osmótico (Satpathy et al, 2004), a proteína hemolítica recombinante (Eroglu et al, 2000) a ultra-sonografia (Zhang et al, 2009), e a endocitose de fase fluida (Wolkers et al, 2001). As técnicas de injeção intracitoplasmática exigem maior habilidade do manipulador, enquanto a proteína hemolítica recombinante pode

ocasionar proteólise celular, já o desbalanço osmótico e a endocitose de fase fluida exigem grande tempo de incubação das células, o que não é desejável, além disso, estas causam prejuízo da viabilidade celular. Como a eletroporação apresenta maior reprodutibilidade, controle, eficiência (MULLER et al, 2001) e facilidade de execução (SCHMOTZER, 2002), ela apresenta grande potencial para ser utilizada em laboratórios de reprodução e preservação de recursos genéticos (FRANCO e DIAS, 2006).

Os pulsos elétricos aplicados ao sistema induzem a permeabilização reversível da membrana plasmática (GOLZIO et al ,2009), porém ainda não se tem a informação precisa de quanto tempo os poros permanecem abertos. Nossos resultados permitiram observar que o tempo de abertura dos poros induzidos pela eletroporação foi dependente do número, duração dos pulsos e da voltagem aplicada, ou seja, de acordo com o tratamento utilizado, e os poros foram se fechando com o passar do tempo de cultivo. A duração dos poros transitórios pode variar ainda com o tipo de membrana celular, níveis de ATP, os íons presentes na solução de eletroporação ( GOLZIO et al ,2009), a temperatura, e a funcionalidade do citoesqueleto (GEHL, 2003). Enquanto a abertura dos poros acontece em segundos, a reestruturação da membrana ocorre em uma faixa de minutos, variando com os parâmetros de eletroporação utilizados (GEHL, 2003). Assim como Rols & Teissie (1998) relataram que a intensidade do campo elétrico (kV/cm) e do número de pulsos podem elevar o percentual de células permeabilizadas e a eficiência de permeabilização a moléculas grandes e pequenas, também observamos o mesmo, já que havia um maior número de ovócitos de T2 marcados com o iodeto de propídeo após a eletroporação, mostrando que o tratamento foi capaz de desestabilizar a membrana plasmática desses gametas. No entanto, ovócitos submetidos a esse mesmo tratamento (T2) apresentaram maior tempo de reestruturação da membrana plasmática que os de T1, o que não é desejável, pois a viabilidade celular está diretamente relacionada com a reestruturação da membrana plasmática. A velocidade de fechamento dos poros variou com os diferentes tratamentos, sendo que o T1 apresentou uma velocidade maior que o T2. Esperava-se, portanto, que os ovócitos T1 apresentassem maior viabilidade celular que os de T2, porém isto não foi constatado. Tem que se ponderar que o maior tempo de abertura dos poros também está diretamente relacionado com maior captação de

solutos por parte da célula, e como os T2 apresentaram maior grau de permeabilização que os T1, isto pode estar relacionado com maior captação de trealose por parte dos ovócitos T2. A trealose possui ação antioxidante, protegendo as células e especialmente as membranas (HERDEIRO et al., 2006), assim é possível que esse efeito benéfico tenha contribuído para a maior viabilidade dos ovócitos T2 quando foram submetidos ao teste de indução química da partenogênese.

Alguns pesquisadores relataram que o fechamento dos poros de células eletroporadas acontece com 10min, 15min, ou até mesmo horas após a eletroporação (SHYRAKASHY et al., 2002; TEISSE et al., 2005), porém como as pesquisas nessa área são recentes, feitas com diferentes células, tratamentos ou meios de eletroporação, dificulta-se traçar um paralelo de comparação e chegar a uma conclusão à respeito dessa questão. Ambos os tratamentos do presente trabalho não indicam qual seria o tempo de cultivo ideal para que houvesse o total fechamento dos poros, assim, futuros experimentos com maior tempo de cultivo, serão necessários para se estabelecer essa informação. Após 90 minutos de cultivo, 50% dos ovócitos de T2 e apenas 15% dos ovócitos de T1 apresentavam poros abertos. Considerando que a reestruturação da membrana está diretamente relacionada com a viabilidade, preconiza-se que os poros se fechem o quanto antes.

Contraditoriamente no teste utilizado em nosso experimento para acessar a viabilidade (indução química da partenogênese), ovócitos de T2 apresentaram maior viabilidade celular que os de T1 (50% e 27,5%, respectivamente). Esses resultados podem indicar que o ponto crucial para a garantia da viabilidade celular não seja necessariamente a permanência dos poros abertos por um período de tempo maior, mas sim o tamanho do poro formado pela eletroporação, o que pode levar à perda de componentes intracelulares.

O tamanho dos poros formados pode estar relacionado com o comprimento do pulso. Nemeç (1986) relatou que o comprimento de pulso está diretamente relacionado com a viabilidade celular, e provavelmente isto está relacionado à formação de poros maiores ou menores.

Os resultados do presente trabalho juntamente com os dados da literatura (NEMEC et al, 1986;FRANCO & DIAS, 2006; PUCIHAR et al., 2008) sugerem que quanto maior o número de pulsos, maior o número de poros formados, ao passo que quanto maior a voltagem aplicada, maior a intensidade, ou grau de penetração dos

pulsos. O comprimento do pulso pode estar relacionado com o raio do poro formado, pois em nosso trabalho, quando os ovócitos foram submetidos a maior voltagem e maior número de pulsos, houve um maior grau de permeabilização das células, enquanto o maior comprimento dos pulsos estaria relacionado com maior perda da viabilidade celular, provavelmente devido à maior perda de componentes intracelulares. Futuras pesquisas de biofísica transmembrana são necessárias para a garantia de uma maior fundamentação dessa hipótese.

A ativação partenogética de ovócitos maturados é uma ferramenta válida para acessar a maturação citoplasmática e a viabilidade dos ovócitos (WANI, 2008). Ambos os tratamentos foram prejudiciais à viabilidade celular quando comparados ao grupo controle (76,25%), no qual ovócitos maturados foram apenas ativados quimicamente. Além disso, a permeabilização excessiva e irreversível, pelo uso de fortes pulsos elétricos, pode causar perda de componentes intracelulares e morte celular (GEHL, 2003).

Apesar de permitir a permeabilização da membrana plasmática, a eletroporação pode ser um agente físico desencadeador da partenogênese (WARE et al., 1989), por induzir oscilações intracitoplasmáticas dos níveis de cálcio, de forma semelhante ao que acontece durante a fertilização (LORCA et al., 1993). No presente trabalho ambos os tratamentos de eletroporação promoveram a elevação da taxa de partenogênese de forma semelhante (26,25%- T1 e 28,75- T2), não sendo detectada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre eles, enquanto a taxa de partenogênese no grupo controle foi, aproximadamente, dez vezes menor (2,5%) que nos grupos eletroporados.

Provavelmente, ambos os tratamentos foram capazes de elevar os níveis de  $Ca^{+2}$  de forma semelhante, que por sua vez inibiram a defosforilação da P34<sup>cdc2</sup> quinase, a qual reduziu a atividade do Fator Promotor da Maturação (MPF) e ativou os ovócitos. Collas et al. (1993) ao trabalharem com ovócitos bovinos, também demonstraram que a ativação elétrica é possível, através de um único pulso elétrico, ou através de múltiplos pulsos, porém observaram que a frequência dos pulsos é que tem um papel crucial na determinação dos índices de partenogênese dos ovócitos ativados fisicamente. Esses resultados levam a crer que as taxas de indução da partenogênese foram semelhantes entre os tratamentos, pois em ambos, o intervalo de tempo entre os pulsos foi semelhante, acarretando oscilações dos níveis  $Ca^{+2}$  de forma parecida. No caso de utilização dos ovócitos para um

programa de criopreservação, a indução da partenogênese pela eletroporação se constitui uma desvantagem, porém em programas de ativação partenogenética, ela se constitui uma vantagem. Assim, para programas de criopreservação, o ideal seria tratamento com o menor intervalo possível entre os pulsos.

O pequeno índice de partenogênese encontrado no grupo controle é natural e provavelmente se deve aos componentes e condições do meio de cultivo. Índices similares também foram encontrados por outros pesquisadores, sendo que Lechniak et al. (1998) observaram uma taxa de ativação espontânea maior, 9,5% dos ovócitos maturados in vitro. Essa diferença provavelmente está relacionada às diferentes condições e aos meios de cultivo. As condições de cultivo in vitro para os ovócitos são diferentes das condições do trato reprodutivo feminino. In vitro, os ovócitos são expostos a uma variedade de estímulos físicos e químicos que podem desestabilizar o bloqueio da meiose e resultar em partenogênese (LECHNIAK et al.1997).

Nossos resultados também demonstram que a indução química da partenogênese em ovócitos bovinos foi mais eficiente que a indução física, e isso provavelmente está relacionado aos diferentes mecanismos de atuação dos protocolos. Esses resultados são condizentes com aqueles descritos em pesquisas de clonagem bovina, nos quais o pulso elétrico utilizado para a fusão do ooplasma receptor com a célula doadora tem se mostrado um ativador pouco eficiente e incapaz de desencadear uma adequada ativação, que suporte o subsequente desenvolvimento de embriões bovinos reconstruídos (COLLAS et al, 1993; CHEONG et al; 2002).

A ativação elétrica e a química possuem diferentes mecanismos de atuação, sendo que a química leva a uma formação de pro núcleos mais rápida e um declínio mais lento do MPF (LEAL & LIU, 1998). Vale a pena ressaltar, que após a ativação elétrica a extrusão do segundo corpúsculo polar tipicamente ocorre (LEAL & LIU, 1998), diminuindo a formação de células diplóides; já a ativação por 6-DMAP em ovócitos bovinos e ovinos resulta na formação de um pro núcleo sem extrusão do segundo corpúsculo polar (Susko-Parrish et al., 1994 ;Ledda et al., 1996). Provavelmente, a formação de partenotos diplóides, por meio da ativação química, seja o fator preponderante para obtenção dos maiores índices de partenogênese, em relação à ativação física mediada pela eletroporação.

Mayes et al. (1995) observaram que ao usar um outro inibidor de proteína quinase, os ovócitos foram ativados, mas não progrediram além do estágio de 4

células, demonstrando que o inibidor de quinase, como o 6-DMAP, pode induzir alguns, mas não todos os eventos relacionados à ativação ovocitária.

No presente trabalho somente foram obtidos embriões até o estágio de 8 células, e o uso do 6-DMAP pode estar relacionado com esses resultados. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo índice de desenvolvimento embrionário foi a baixa qualidade dos ovócitos utilizados devido a efeitos ambientais ocorridos durante o período experimental.

## **6-CONCLUSÃO**

A eletroporação se mostrou um método prático e eficaz para induzir a abertura de poros na membrana plasmática de ovócitos bovinos. O tratamento T2 apresentou melhores resultados que o T1, porém ambos os tratamentos induziram o aumento da taxa de partenogênese e redução do desenvolvimento embrionário. Diante dos resultados obtidos faz-se necessário avaliar parâmetros mais adequados para eletropermeabilização de ovócitos bovinos, de forma a permitir a abertura de poros transitórios sem comprometer a capacidade de desenvolvimento embrionário.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAGI, S., ADACHI, N., MATSUKAWA, K., KUBO, M., TAKAHASHI, S. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, p. 264–272. 2003.
- BÁRDOS-NAGY, I.; GALÁNTAI,R.; FIDY,J. Effect of trealose in low concentration on the binding and transport of porphyrins in liposome-human serum albumin system. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1512, p.125-134, 2001.
- BOS-MIKICH, A.,WOOD, M.J., CANDY, C.J., WHITTINGHAM, D.G.. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. **Biol. Reprod.** v.53, p. 780–785. 1995.
- BREVINI-GANDOLFI T., FAVETTA L.A., LONERGAN P., GANDOLFI F. The mechanism regulating maternal mRNA stability and translation is affected in bovine embryos with low developmental competence. **Theriogenology**, v.53, p.268 abstr. .2000.
- CERRUTTI, P.; DE HUERGO, M. S.; GALVAGNO, M.; SCHEBOR, C.; BUERA M. D.; **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 54, p 575, 2000.
- CHE, L.; LALONDE, A.; BORDIGNON, V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. **Theriogenology**, v.67, p.1297–1304. 2007.
- CHEN, S.U.; LIEM, Y.R.; CHAO, H.N.; YANG, Y , S.; LEE,T.Y. Effect of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocytes freezing- a review article. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 202, p. 101-107. 2003.
- CHEN, C; SMYE, E.S.W.; ROBINSON, E.M.P.; EVANS, J.A. Membrane electroporation theories: a review. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v.44, p.5-14. 2006.
- CHEONG, H.T., IKEDA, K., MARTINEZ DIAZ, M.A., KATAGIRI, S., TAKAHASHI, Y. Development of reconstruction pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells. **Reprod. Fertil. Dev.** v.12, p.15–20, 2000.
- CHEONG, H.T., PARK, K.W., IM, G.S., LAI, L., SUN, Q.Y., DAY, B.N., PRATHER, R.S. Effect of elevated Ca<sup>2+</sup>concentration in fusion/activation medium on the fetal fibroblast nuclear transfer embryos. **Mol. Reprod. Dev.**v. 61, p.488–492, 2002.
- CHIAN RC, SON WY, HUANG JY, CUI SJ, BUCKETT WM, TAN SL. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. **Fertil Steril**, v. 84(Suppl 1), p.S36, 2005.
- CHOI, J.Y., KIM, C.I., PARK, C.K., YANG, B.K., CHEONG, H.T. Effect of activation time on the nuclear remodeling and in vitro development of nuclear transfer embryos derived from bovine somatic cells. **Mol. Reprod. Dev.**, v.69, p.289–295, 2004.

COLLAS, P., SULIVAN, E.J., BARNES, F.L. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. **Mol. Reprod. Dev.** v. 34, p. 224–231. 1993.

COLLAS, P., CHANG, T., LONG, C., ROBL, J.M. Inactivation of histone H1 kinase by Ca<sup>2+</sup> in rabbit oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** v. 40, p. 253–258, 1995.

COMIZZOLI P., MARQUANT-LE GUIENNE B., HEYMAN Y., RENARD J.P. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes, **Biol. Reprod.** v.62, p.1677–1684, 2000.

DE LOOS, F; VAN VLIET, C; VAN MAURIK, P; KRUIP, THAM. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.197-204, 1989.

EROGLU, A; RUSSO, M.J.; BIEGANSKIL R.; FOWLER, A.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; TONER, M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v.18, p. 163- 167, 2000.

EROGLU, A.; LAWITTS, J.A.;TORNER M.; TOTH, T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human. **Fertility and Sterility**, v.77, p.152-158, 2002.

EROGLU, A.; LAWITTS, J.A.;TORNER M.; TOTH, T.L. Quantitative microinjeção of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. **Cryobiology**, v.46, p.121-134, 2003.

FABBRI R, PORCU E, MARSELLA T, ROCCHETTA G, VENTUROLI S, FLAMIGNI C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. **Hum. Reprod** v. 16, p. 411– 6. 2001.

FRANCO, C. A.D.F; DIAS, A.J.B. Eletroporação de ovócitos bovinos maturados in vitro para internalização de trealose. **Anais do 11º Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Norte Fluminense**, 2006.

GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. **Acta Physiol Scand**, v.177, p.437–447. 2003.

GOLZIO, M.; CIOBANU, F.; KOVACS, E.; TEISSIE, J. Control by calcium of mammalian cell membrane electroporation. **Biophysical Journal**, 1854-Pos Board B698, 2009.

HAGEMANN L.J., HILLERY-W&HOLD FL, L&B&LED-RUTLEDGE ML, FIRST NL. Activation of murine oocytes with Ca<sup>2+</sup> ionophore and cycloheximide. **J Exp Zool**; v.271, p. 57-61, 1995.

KOO, O.J.; JANG, G.; KWON, D.K.; KANG, J.T.; KWON, O.S.; PARK, H.J.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Electrical activation induces reactive oxygen species in porcine embryos. **Theriogenology** v.70, p.1111–1118, 2008.

KUWAYAMA M, VAJITA G, KATO O, LEIBO SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.11, p.300–8. 2005.

LANGENDONCKT A.V., DONNAY I., SCHUURBIERS N., AUQUIER P., CAROLAN C., MASSIP A., DESSY F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **J. Reprod. Fertil.** v.109, p. 87–93, 1997.

LEAL, C.L.V.; LIU, L. Differential effects of kinase inhibitor and electrical stimulus on activation and histone H1 kinase activity in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 52, p.51–61.1998.

LEDDA, S., LOI, P., BOGLIOLO, L., MOOR, R.M., FULKA, J. Jr. The effect of 6-dimethylaminopurine 6-DMAP on DNA synthesis in activated mammalian oocytes. **Zygote** v.4, p. 7–9, 1996.

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, v. 29, p.37-47, 2008.

LECHNIAK D., CIESLAK, D., SOSNOWSKI, J. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.779-785, 1998.

LIU, L., MOOR, R.M. Factors affecting electrical activation of porcine oocyte matured in vitro. **Anim.Reprod. Sci.**, v.48,p. 67–80, 1997.

LIU, L., BOBVANOVI, F., MOOR, R.M., Intracellular calcium images in porcine oocytes following electrical stimulation in different electroporation media. **Theriogenology** v.47, p.209, 1997.

LIU, L., JU, J.C., YANG, X. Histone H1 and MAP kinase activities in activated bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.155. 1998a.

LIU, L., JU, J.C., YANG, X. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. **Mol. Reprod. Dev.** v.49, p.298–307. 1998b.

LONERGAN P., GUTIERREZ-ADAN A., PINTADO B., FAIR T., WARD F.A., DE LA FUENTE J., BOLAND M.P. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor and two housekeeping genes in bovine twocell embryos and blastocysts produced in vitro, **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.146–152. 2000.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.** ,v.41, p. 427–437, 2001.

LORCA T, CRUZALEGUI FH, FESQUEST D, CAVADORE JC, MERY J, MEANS A. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. **Nature**, v.366, p.270–3. 1993.

MAYES, M.A., STOGSDILL, P.L., PRATHER, R.S. Parthenogenetic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. **Biol. Reprod.** ,v.53, p.270–275. 1995.

MENG, L; ELY, J.J. ; STOUFFER, R.L. ; WOLF, D.P. . Rhesus Monkeys Produced by Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, v.57, p.454 -459, 1997.

MÉO, S.C., YAMAZAKI,W., FERREIRA, C.R., PERECIN, F., SARAIVA, N.Z., LEAL, C.L., GARCIA, J.M. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. **Zygote** v.15, p.295–306. 2007.

MÉO, S. C., FERREIRA, C. R., PERECIN F., SARAIVA N. Z., TETZNER, T. A. D., YAMAZAKI W., LEAL C. L. V., MEIRELLES F. V., GARCIA J. M. Karyoplast exchange between strontium- and 6-DMAP-parthenogenetically activated zygotes of cattle **Animal Reproduction Science**, 2009.

MIKKELSEN, A.L.; LINDENBERG, S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. **Human Reproduction**, v. 16, n°8, p.1714-1718, 2001.

MOTLIK J, KUBELKA M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.27, p.366–375, 1990.

MULLER, K.J.; Sukhorukov, V.L.; Zimmermann, U. Reversible Electroporation of Mammalian Cells by High-Intensity, Ultra-Short Pulses of Submicrosecond Duration. **J. Membrane Biol.**, v. 184, p.161–170, 2001.

MUSSAUER, H.; SUKHORUKOV,V.L.; ZIMMERMANN,U. Trehalose improves survival of eletrotransfected mammalian cells. **Cytometry**, v.45, p.161-169, 2001.

NEMEC, L. A. The effect of electroporation upon the survivability of murine embryos. M.S. Thesis. **Texas A&M University**. p. 1-63, 1986.

OZIL, J.P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile stimulation. **Development** , v.109, p.117-127. 1990.

PAVLIN, M., V. LEBEN, AND D. MIKLAVCÍČ. Electroporation in dense cell suspension—theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1770, p.12–23, 2007.

PRATHER, R.S., EICHEN, P.A., NICKS, D.K., PETERS, M.S. Artificial activation of porcine oocytes matured in vitro. **Mol. Reproduction Dev**. v.28, p.405-409, 1991.

PEREIRA, C. S.; LINS, R. D.; CHANDRASEKHAR, I.; FREITAS, L. C. G.; HÜNENBERGER, P. H. **Biophysical Journal** v.86, p. 2273, 2004.

PORCU E, FABBRI R, DAMIANO G, GIUNCHI S, FRATTO R, CIOTTI PM. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. **Mol Cell Endocrinol**, v.169, p.33–7; 2000.

PROCHAHA, R., KANKA, J., SUTOVSKY, P., FULKA, J., MOTLIK, J. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. **J. Reproduction Fertility** v.96, p.725-734, 1992.

PUC, M., T. KOTNIK, L. M. MIR, AND D. MIKLAVCĀICĀ. Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electroporation. **Bioelectrochemistry** v.60, p.1–10, 2003.

PUCIHAR, G.; KOTNIK, T.; MIKLAVC, D.; TEISSIE, J. Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electroporated Cells. **Biophysical Journal**, v. 95, p.2837–2848, 2008.

ROBERT C., HUE I., MCGRAW S., GAGNE D., SIRARD M. Quantification of Cyclin B1 and p34cdc2 in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes and Expression Mapping of Genes Involved in the Cell Cycle by Complementary DNA Macroarrays. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1456–1464 , DOI 10.1095/biolreprod.102.002147. 2002.

ROLS, M.P.; TEISSIÉ, J. Electroporation of mammalian cells to macromolecules: Control by pulse duration. **Biophysical Journal**, v.75, p.1415-1423, 1998.

SANTOS, L.F.M.; OLIVEIRA, J.G.P.; MAIA, R.C.; RUMJANEK, V. M. Mitotracker green is a p-glycoprotein substrate. **Bioscience Reports**, v. 23, No. 4, 2003.

SATPATHY, G.R.; TOROK, Z.; BALI, R.; DWYRE, D.M.; LITTLE, E.; WALKER, N.J.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; TSVETKOVA, N.M. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization. **Cryobiology**, v.49, p.123-136, 2004.

SCHMEER, M., T. SEIPP, U. PLIQUETT, S. KAKORIN, AND E. NEUMANN. Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cell-pellets. **Phys. Chem.** v.6, p.5564–5574, 2004.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, n. 1, p.59-72, 2000.

SHEN, P.C.; LEE, S.N.; LIU, B.T.; CHU, F.H.; WANG, C.H.; WU, J.S.; LIN, H.H.; CHENG, W.T.K. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.106, p. 1–12, 2008.

SHIN, S.J., LEE, B.C., PARK, J.I., LIM, J.M.,HWANG,W.S. .A separate procedure of fusion and activation in an ear fibroblast nuclear transfer program improves preimplantation development of bovine reconstituted oocytes. **Theriogenology** v.55, p.1697–1704, 2001.

SHIRAKASHI, R.; KÖSTNER, C.M.; MÜLLER, K.J.; ZIMMERMANN, U.; SUKHORUKOV, V. L. Intracellular delivery of trehalose into mammalian cells by electroporation. **Membrane Biology**, v.189, p.45-34, 2002.

SOARES, C.S; SILVA, C.O. Determinação teórica das conformações mais estáveis da trealose em solução aquosa. **Quim. Nova**, v31, n2, p.280-284, 2008.

SUM, A. K.; FALLER, R.; DE PABLO, J. J. **Biophysical Journal** v. 85, p.2830, 2003.

SUN, F.Z., HOYLAND, J., HUANG, X., MASON, W., MOOR, R.M. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. **Development** v.115, p.947-956, 1992.

SUSKO-PARRISH, J.L., LIEBFRIED-RUTLEDGE, M.L., NORTHEY, D.L., SCHUTZKUS, V., FIRST, N. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Dev. Biol.** ,v.166, p.729–739. 1994.

TAIEB R, THIBIER C, JESSUS C. On cyclins, oocytes, and eggs. **Mol Reprod Dev** v.48, p.397–411. 1997.

TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M.P. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 270 – 280, 2005.

THOUAS, G.A.; TROUNSON A.O.; WOLVETANG, E.J.; JONES, G.M. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. **Biology of Reproduction** v.71, p.1936–1942, 2004.

VAJRALA, V.; CLAYCOMB, J., SANABRIA Y. H.; MILLER J. H. J. Effects of oscillatory electric fields on internal membranes: an analytical model. **Biophysical Journal** v. 94, p. 2043–2052, 2008.

VAJTA, G.; HOLM, P; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. Open pulled straw (OPS):vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction. Development**, v.51, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G. Criopreservação de ovócitos e embriões produzidos in vitro. **In: reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, Rio Grande do Sul. Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre**, v.28, p.85-94 (supl.), 2000.

VIANA, J.H.M; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.917-924, 2007.

WANG, Z.G.; WANG, W.; YU, S.D.; XU, Z.R. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 292–301, 2008.

WANI, C.B. Chemical activation of in vitro matured dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes: Optimization of protocols. **Theriogenology**, v. 69, p. 591–602, 2008.

WARD F., RIZOS D., CORRIDAN D., QUINN K.M., BOLAND M.P, LONERGAN P. Paternal influence on the time of the first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Mol. Reprod. Dev.** v.60, p.47–55, 2001.

WARE CB, MAIKI-LAURILA M, FIRST NL. Age dependence of bovine oocyte activation. **Gamete Research**, v.22, p.265–75, 1989.

WEAVER ,J.C. Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. **IEEE Trans Dielectr Electr Insul** v.10(5), p.754–768, 2003.

WOLKERS, W.F.; WALKER, N.J.; TABLIN, F.; CROWE, J.H. Human Platelets Loaded with Trehalose Survive Freeze-Drying. **Cryobiology**, v. 42, p. 79–87, 2001.

WRIGHT DL, EROGLU A, TONER M, TOTH TL. Use of sugars in cryopreserving human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.9,p.179–86 ,2004.

YOON TK, KIM TJ, PARK SE, HONG SW, KO JJ, CHUNG HM, et al. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilizationembryo transfer program. **Fertil Steril**, v.79, p.1323– 6, 2003.

YOUNIS, A.; CARNOVALE, D.; BUTLER, W.; EROGLU, A. Application of intra- and extracellular sugars and dimethylsulfoxide to human oocyte cryopreservation. **J Assist Reprod Genet** DOI 10.1007/s10815-009-9316-8, 2009.

ZHANG, S.Z.; FAN, J.L.; XU, X.G.; CHEN, G.M.; ZHU, F.M.; YAN, L.X. An experimental study of the use of ultrasound to facilitate the loading of trehalose into platelets. **Cryobiology** v. 59, p. 135–140, 2009.

**ANEXO A- Lista de Referência dos Reagentes (Laboratório, Marca, código, Cidade, País)**

**6-dimetilaminopurina (6-DMAP)**- Sigma- Aldrich, 076k1574, St Louis-USA

**Estreptomicina**- Sigma- Aldrich, S1277, St Louis-USA

**Etanol**- Quimibras Indústrias Químicas S.A.- Reagen- 10033, Rio de Janeiro- Brasil

**FSH**- Bioniche- Folltropin- Belleville- Canadá

**Iodeto de Propídeo** Sigma, P-4170, St Louis-USA

**LH** Bioniche- Lutropin-V- Belleville- Canadá

**Meio 199 Bicarbonatado** Sigma- Aldrich, M5017, St Louis-USA

**Meio 199- Hepes** Sigma- Aldrich, St Louis-USA

**Óleo Mineral** Sigma M-8410, St Louis-USA

**PBS** – Produzido no laboratório a partir da fórmula: NaCl (Merck 1.06404.1000) 0,8 g KCl (Sigma, P-5405) 0,02 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, S-0876) 0,115 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma P-5379) 0,02 g Água Milli Q qsp 100 mL

**Penicilina** Sigma- Chemical CO, P3032, St Louis-USA

**PVA** Sigma- Chemical CO, P8136, St Louis-USA

**Soro Fetal Bovino**- Nutricell- Campinas- SP

**Sulfato de Magnésio** Sigma- Chemical CO, M2646, St Louis-USA

**Trealose** Sigma- Aldrich, T0167, St Louis-USA

**ANEXO B- Lista de Referência dos Equipamentos (Laboratório, Marca, Cidade, País)**

**Eletromanipulador** - BTX, ECM 2001, Holliston, EUA

**Microscópio de Fluorescência** – Nikon, TE 300, EUA

**Placa de Eletroporação** – BTX, 450, Holliston, EUA